

Familienuntersuchungen zur Erbllichkeit
der Restaktivität der menschlichen Serum-Cholin-
esterase nach Vergiftung mit DFP

von
Hans Böckler
aus
Feuchtwangen



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Familienuntersuchungen zur Erbllichkeit
der Restaktivität der menschlichen Serum-Cholin-
esterase nach Vergiftung mit DFP

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Hans Böckler
aus
Feuchtwangen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.1980

Inhalt	1
A. EINLEITUNG	3
Allgemeines über Alkylphosphate mit besonderer Berücksichtigung des DFP	
B. ENZYMATISCHER ABBAU VON ORGANOPHOSPHORSÄUREVERBINDUNGEN	5
C. PROBLEMSTELLUNG	8
D. VERSUCHSAUFBAU UND DURCHFÜHRUNG	
1. Meßmethode und Versuchsassaparatur nach Warburg	9
2. Anti - Cholinesterase - Technik	13
E. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	
1. Vorbereitungen	
1.1 Das Untersuchungsgut	15
1.2 Herstellung des DFP-Ansatzes, der Verdünnungs- und der Substratlösung	16
2. Ablauf der Messung	
2.1 Inkubation	18
2.2 Messung	18
F. ERGEBNIS	
1. Meßwerte von 24 Familien	19
2. Prüfung der Frage einer autosomalen Vererbung	23
3. Prüfung der Frage einer polygenen Vererbung	25
G. DISKUSSION	33
Literaturverzeichnis	36

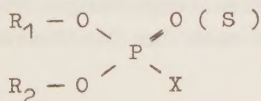
A. EINLEITUNG

Die Stoffgruppe der Alkylphosphate hat in den dreißiger Jahren unseres Jahrhunderts erstmals industrielle Bedeutung erlangt. 193) wurden bei den Bayer - Werken von SCHRADER die stark insektiziden Eigenschaften dieser Verbindungen entdeckt. Überdies kamen sie als chemische Kampfstoffe (CLARKE, R 1969) und, nach der Aufklärung des Wirkungsmechanismus, als Medikamente in engsten Kontakt mit dem Menschen.

Ihre Toxizität beruht hauptsächlich auf der irreversiblen Hemmung der Cholinesteraseaktivität, indem sie eine feste Bindung mit dem Enzym eingehen. Die dadurch erzielbare Beeinflussung der cholinergen Erregungsübertragung an den motorischen Endplatten sowie an den entsprechend funktionierenden Synapsen reicht von einer Übererregbarkeit (Bahnung infolge leicht erhöhter Acetylcholin-konzentration) bei geringen Dosen bis zu völliger Blockade durch Dauerdepolarisation (GROB, 1947).

Der Organismus kann Verluste an aktiver Cholinesterase nur sehr langsam ersetzen. Eine Vergiftung hat bei entsprechender Dosis den Tod durch Lähmung der Atemmuskulatur oder durch Herzstillstand zur Folge. Therapeutisch werden Alkylphosphate zur Besserung der Muskelermüdbarkeit bei Myasthenia gravis eingesetzt und in der Augenheilkunde kommt u.a. DFP zur lokalen Anwendung zwecks Herbeiführung maximaler Miosis beim Glaukom.

Die chemische Grundstruktur dieser Verbindung gibt SCHRADER 1950 so an:



Dabei sind R_1 und R_2 je ein Methyl- Äthyl- oder Isopropylrest und X ein azider Rest.

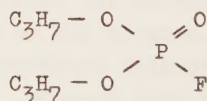
Der prominenteste Vertreter seiner Art ist wohl das E 605 (Parathion, O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thio-phosphat), das im Körper durch den Umbau zu E 600 (Paraoxon, O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) eine erhebliche Wirkungssteigerung erfährt.

DFP (Diisopropyl-fluoro-phosphat) ist ein sehr lipophiles Alkylphosphat, das biologische Membranen leicht zu durchdringen vermag und das Paraoxon an Toxizität deutlich übertrifft. Als Vergleichsmaßstab sei der sog. I_{50} -Wert herangezogen, der die molare Konzentration des Hemmstoffes angibt, die nötig ist, um die Cholin-esteraseaktivität auf die Hälfte zu reduzieren:

SCHRADER (1963) gibt für Pferdeserum und DFP eine I_{50} von $1,3 \times 10^{-9}$ an, für Pferdeserum und E 600 beträgt sie "nur" $1,4 \times 10^{-7}$ (ROSIVAL et al., 1959).

Hoher Dampfdruck und starke Eigenhydrolyse (nach SCHRADER ist DFP in 1%iger wässriger Lösung nach 72 Stunden vollständig hydrolysiert) sind weitere Eigenschaften dieses als Flüssigkeit der Dichte $D_4^{20} = 1,0622 \text{ kg/l}$ vorliegenden Stoffes, die bei der Laborarbeit besondere Maßnahmen nötig machen. Die Wasserlöslichkeit ist 1,5% bei 20°C .

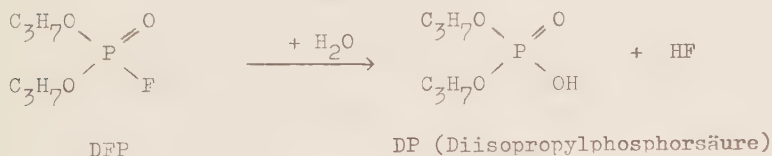
Die Strukturformel von DFP ist



Mit dem Auftreten von Resistenzen bei verschiedenen Insekten gegen Alkylphosphate und im Zusammenhang mit dem klinischen Einsatz sowie mit akzidentellen oder auch absichtlich herbeigeführten Vergiftungen von Mensch und Tier erhob sich die Frage nach dem Stoffwechsel der Gifte.

B. ENZYMATISCHER ABBAU VON ORGANOPHOSPHORFÜHRENDEN VERBINDUNGEN

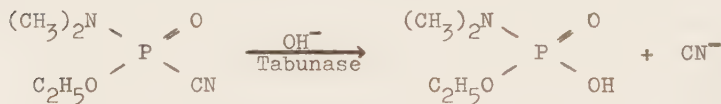
MAZUR und BODANSKI (1946 a) fanden in Plasma und Gewebe von Menschen und Kaninchen ein DFP hydrolysierendes Enzym. DFP wurde nur zu einem sehr geringen Teil an der Alkyl - Ester - Bindung gespalten, sondern fast ausschließlich an der Phosphor - Fluor - Bindung. Das Enzym zeigte sich mit keiner bekannten Cholinesterase oder Phosphatase identisch. MAZUR und BODANSKI (1946 b) gelang es, das Enzym 30 - fach zu konzentrieren unter Verlust der Phosphatase-, Esterase- und Cholinesteraseaktivität. Sie gaben ihm den Namen "Phosphorfluorase" bzw. "Fluorophosphatase" (GROB u. Mitarb. 1947). WASSERMANN, HANSEN und SCHAUM (1967) bestimmten u.a. die Stoffwechselprodukte von DFP und stellten den überwiegenden Abbau zu DP und F nach folgendem Schema fest:



ALDRIDGE (1953 a) unterschied zwei Typen von Serum-esterasen, von denen die eine durch E 600 hemmbar war (B - Esterase) und die andere nicht (A - Esterase, Aryl-, Aromaticesterase). Das Vorhandensein der A - Esterase wurde im menschlichen Serum und bei zehn Tierarten nachgewiesen. Weiterhin fand ALDRIDGE (1953 b) ein E 600 hydrolysierendes Enzym, das sich identisch mit der bereits bekannten A - Esterase erwies, jedoch nicht mit anderen sauren und alkalischen Serumphosphatasen. Für Aktivitätsschwankungen innerhalb der einzelnen Gattungen sah er Proteinunterschiede als Ursachen an.

AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (1954 a, b, c, d, e, 1955 a, 1955 b, 1957) beschäftigten sich ausführlich mit der enzymatischen Spaltung von Tabun und nannten das entsprechende Enzym zunächst "Tabunase". Die Tabunase war aber nicht spezifisch für Tabun und deshalb bezeichneten die Autoren organische Phosphorverbindungen hydrolysierende Enzyme bald als "Phosphorylphosphatasen". In Cohnschen Fraktionen trennten sie aus menschlichem Serum u.a. die Phosphorylphosphatase von den anderen Enzymen ab (Frakt. IV - 1). Tabun wird bei der hydrolytischen Spaltung, ähnlich wie das DFP an der P-F-Bindung, an der P-CN-Bindung getrennt. Bei Untersuchungen über die Spezifität der Phosphorylphosphatase hydrolysierte diese außer Tabun auch noch DFP und E 600. Die Autoren vermuten, daß E 600 außerdem noch durch die A - Esterase von Aldridge gespalten wird, die wahrscheinlich auch in der Fraktion IV - 1 anwesend ist.

Die Spaltung von Tabun verläuft so:



In der Folgezeit stellte sich für den Abbau von E 600 im Serum die Existenz eines sehr spezifischen Enzyms (EC 3.1.1.2) heraus: MAIN konnte 1960 die Paraoxonase aus Schafserum durch 330 - 385-fache Reinigung 80 - 95%ig rein darstellen. Er ermittelte ein Molekulargewicht von 35000 - 50000. ERDÖS und BOGGS (1961), und SKRINJARIC - SPOLJAR u. Mitarb. (1968) untersuchten mittels unterschiedlicher wechselseitiger Beeinflussung der Paraoxonaseaktivität mit selektiven Hemmstoffen bzw. mit verschiedenen Substraten das Vorhandensein verschiedener E 600 - spaltender Aktivitäten.

KRISCH (1968) sowie ZECH und ZÜRCHER (1974) nehmen bei direkter photometrischer Messung des beim Paraaxonabbau anfallenden p-Nitrophenols eine Aufteilung in zwei sich überlagernde Gruppen an. Außerdem zeigt die so untersuchte Paraaxonase Michaelis-Menten-Kinetik. ZECH und ZÜRCHER bestimmten beim Kaninchen das Molekulargewicht der Paraaxonase mit $M = 500000$.

GELDMACHER-v. MALLINCKRODT et al. fanden, hauptsächlich unter Anwendung der Anti-Cholinesterase-Technik (siehe S. 13 ff), aber auch der Methode nach KRISCH eindeutig - eine trimodale Verteilung der Serum-Paraaxonaseaktivität mit Normalverteilung innerhalb der einzelnen Gruppen nach logistischer Transformation der Werte nach KOLLER (1955)(siehe S. 23).

- die Erbllichkeit der Aktivität nach einem 2-Allele-System mit Gültigkeit der Hardy-Weinberg-Regel
- eine hohe Substratspezifität, die die Spaltung einiger entsprechender Thionophosphate, Paraaxon-Homologer, die die Nitrogruppe nicht in p-Position haben und einfach und doppelt desalkylierter Paraoxonderivate nicht mehr erlaubt.

GELDMACHER-v. MALLINCKRODT und FLÜGEL (1978) untersuchten die Kinetik des Enzyms genauer und maßen nach der Methode von KRISCH die K_m - und V_{max} -Werte an je zwei Vertretern einer Aktivitätsgruppe und mit von der Paraaxonase hydrolysierbaren Substratvarianten.

C. PROBLEMSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit soll klären, ob die Cholinesteraserestaktivität nach Vergiftung mit DFP des menschlichen Serums irgendwelchen Vererbungsgesetzmäßigkeiten unterliegt. Das Ergebnis soll u.a. einen Beitrag leisten zur Lösung der Fragen nach der Existenz einer eigenen DFPase im menschlichen Serum oder der Identität einer eventuellen DFP abbauenden Aktivität mit der menschlichen Serum-Paraoxonase.

So fand BURGER (1979) keine Korrelation zwischen der Paraoxonaseaktivität des menschlichen Serums, gemessen nach der im folgenden genauer beschriebenen Anti-Cholinesterase-Technik, und der Serum-Cholinesteraserestaktivität nach Vergiftung mit DFP. Sollte die Untersuchung der Erbllichkeit des letztgenannten Effektes ebenfalls ein stark von dem der Paraoxonase abweichendes Verhalten zeigen, könnte die Identität einer eventuellen Serum-DFPase mit der Serum-Paraoxonase mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Eine Aussage über die Existenz eines DFP abbauenden Enzyms im menschlichen Serum läßt sich mit den bisherigen Erkenntnissen nicht machen. Nötig ist die Zuhilfenahme der Ergebnisse einer Reihe anderer Arbeiten, die noch nicht abgeschlossen sind.

D. VERSUCHSAUFBAU UND DURCHFÜHRUNG

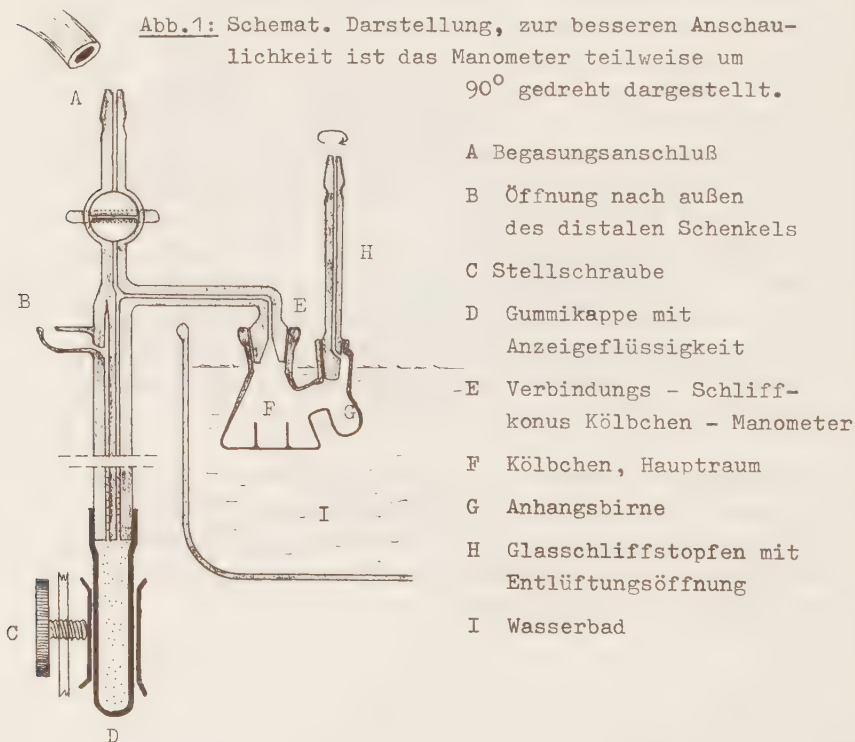
1. Methode und Versuchsapparatur nach Warburg

Die WARBURG - Apparatur ist eine Einrichtung, die zum genauen Messen kleinster Gasmengen konzipiert ist. Sie findet Verwendung bei der Beurteilung von Vorgängen, die entweder selbst ein Gas als Reaktionsprodukt entstehen lassen, Gas verbrauchen, oder ein Gas als Nebenprodukt abscheiden. Ebenso kann man bei geeigneter Sachlage eine Gas produzierende Nachreaktion anschließen. Für unsere Belange haben wir einen Bicarbonatpuffer verwendet, der bei der Reaktion mit anfallenden Säureäquivalenten stöchiometrisch CO_2 abgibt. Durch exaktes Einhalten bestimmter Zeitintervalle erhält man Reaktionsgeschwindigkeitsgrößen. Die Messung bezieht sich auf die Druckänderung in einem geschlossenen System, die dann in Volumeneinheiten umgerechnet wird.

Zu den Hauptteilen der Versuchsanordnung gehört das Reaktionskölbchen, das in unterschiedlichen Ausführungen beziehbar ist. Unser Modell besitzt die Grundform eines Erlmeyerkolbens mit einem Schliffkonus an der Öffnung. Eine kleine seitliche Anhangsbirne mit einem Fassungsvermögen von etwas mehr als 0,5 ml hat außer zum Hauptraum eine Entlüftungsöffnung nach außen, die durch Verdrehen eines Schliffstopfens gasdicht verschließbar ist. Die Gefäße haben ein Volumen von ca. 11 - 14 ml, sind auf drei Kommastellen genau geeicht (μl - Bereich) und mit einer Seriennummer gekennzeichnet.

Das zugehörige Manometer bildet ein U - Rohr, bestehend aus zwei Kapillaren mit Millimeterskala und Nullmarkierung in der Mitte, die an ihrem unteren Ende über den Hohlraum einer Gummikappe, die die Anzeigeflüssigkeit enthält, kommunizieren.

Die manuelle Veränderung des Flüssigkeitsstandes (Nulljustierung) wird durch Quetschung der Gummikappe vorgenommen. Bei Aufsicht auf die Skala steht der linke Schenkel des Manometers mit der Umgebungsluft in Verbindung, der rechte über einen Schliffansatz mit dem Reaktionsgefäß. Das Kölbchen kann über den mit einem Hahn verschließbaren Anschlußstutzen an der Spitze des Manometers begast werden. Das Manometer besitzt ein Eigenvolumen von ca. 1-1,5ml und ist wie die Kölbchen geeicht und nummeriert. Es wird in die Apparatur eingehängt, die vermittels eines ständig durchmischten Wasserbades für eine mit Thermostat einstellbare, konstante Temperatur sorgt. Der in gewissen Grenzen variierbare Schüttelmechanismus bewirkt die für die jeweiligen Versuchsbedingungen richtige Durchmischung der Ansätze. Die Anlage erlaubt gleichzeitig 14 Messungen (Warburg - Apparat Typ V 85 der Fa. Braun, Melsungen, s. Abb.1)



Alle Glasschliffe müssen mit einem speziellen Schliff-fett abgedichtet werden. Bei der Manometer - KÖlbchen - Verbindung und beim Einsetzen des Glasstoßens in die KÖlbchen ergeben eine übertrieben dicke Fettschicht oder zu stark abgenutzte Schliffe einen Volumenfehler bezüglich des geeichten Innenraumes, da sich dann die Verbindung zu wenig oder zu weit ineinanderschiebt. Ein solcher Fehler wirkt sich direkt auf das Meßergebnis aus. Geringe Unterschiede im Durchmesser beider Kapillaren eines Manometers und auch in der Oberflächenspannung der Anzeigenflüssigkeit lassen die Ausgangsstellung der beiden Menisci nicht immer gleich sein. Bei Beginn einer jeden Messung wird aus diesem Grund der proximale Meniskus auf Null gestellt und die "Vordifferenz" notiert. Während der Reaktion erfährt der Innenraum wegen der Verschiebung der Flüssigkeitssäulen eine Volumenänderung. Um diese zu kompensieren (erwünscht ist eine reine Druckänderung) muß man vor dem Ablesen den proximalen Meniskus wieder auf Null stellen. Sollte der Anzeigebereich der Skala einmal nicht ausreichen, nimmt man eine Zwischenablesung vor, läßt den bis dorthin entstandenen Druck ab und beginnt den Meßvorgang von neuem. Bei der abschließenden Addition der einzelnen Flüssigkeitssäulen muß für jede derartige Unterbrechung die Vordifferenz selbstverständlich erneut berücksichtigt werden.

Die umgesetzte Gasmenge wird wie folgt berechnet:

$$X (\mu\text{l}) = k \cdot h (\text{mm})$$

k = Konstante, die die speziellen Versuchsbedingungen erfaßt.

h = Druckdifferenz in mm Flüssigkeitssäule
(Manometerwert minus Vordifferenz)

Die Konstante k berechnet sich nach SÜLLMANN (1964) so:

$$k = \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha}{p_0} \quad (\mu\text{l} / \text{mm})$$

Dabei ist

V_G das Gasraumvolumen in μl

T die Versuchstemperatur in $^{\circ}\text{K}$

V_F das Volumen der Flüssigkeit im Ansatz in μl

α der Bunsensche Absorptionskoeffizient:

Er ist das auf 0°C und 760 Torr umgerechnete Volumen der Gasmenge, die bei der angegebenen Temperatur vom Lösungsmittel aufgenommen wird. bei einem Teildruck des Gases von 760 Torr.

Er beträgt für CO_2 ungefähr $0,54 \frac{\text{Vol.-Ant. Gas}}{\text{Vol.-Ant. Lösungsmittel}}$

p_0 der (techn.) Normdruck (1 at bei 20°C)

$\sim 10^4$ mm Wassersäule

Speziell für unsere Versuche gilt:

$$V_G = V_{\text{Kölbchen}} + V_{\text{Manometer}} - V_F$$

$$T = 310^{\circ}\text{K} \quad (37^{\circ}\text{C})$$

$$V_F = 2 \text{ ml}$$

$$k = \frac{(V_K + V_M - 2) \cdot 10^3 \mu\text{l} \cdot \frac{273}{310} + 2 \cdot 10^3 \mu\text{l} \cdot 0,54}{10^4 \text{ mm}} =$$

$$= ((V_K + V_M - 2) \cdot 880 + 1080) \cdot 10^{-4} \frac{\mu\text{l}}{\text{mm}}$$

(Volumenangaben V_K und V_M sind hier in ml einzusetzen !)

2. Anti - Cholinesterase - Technik

Diese Methode wird von GELDMACHER-v. MALLINCKRODT et al. seit 1969 mit Erfolg bei der Erforschung der Paraoxonase eingesetzt. Sie benutzt die im Serum vorkommende Pseudo-cholinesterase (EC 3.1.1.8) als Indikator der Cholin-esterasehemmstoffe abbauenden Aktivitäten.

Die Indikatorreaktion läuft folgendermaßen ab:
Ein Bicarbonatpuffer enthält als Substrat für die Cholinesterase z.B. Acetylcholin. Die bei der Spaltung in Cholin und Essigsäure freiwerdende Säure wird abgepuffert unter Entstehung von Kohlendioxid. Letzteres wird in der Warburg - Apparatur gemessen (Manometrische Methode von AMMON (1934) in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (1958), jedoch bei einem pH - Wert von 7,2).

Da die Erythrozyten eine Acetyl-Cholinesterase enthalten (EC 3.1.1.7), die sich bei hämolytischen Erscheinungen der Seren, evtl. hervorgerufen durch das Zentrifugieren, sehr störend auswirken würde, verwendeten wir als Substrat Butyrylcholinjodid, das von der Erythrozyten-Cholinesterase nicht abgebaut werden kann (GOEDDE, DOENIKE, ALTLAND 1967).
Mit diesem Substrat entsteht übrigens mehr als doppelt soviel Kohlendioxid wie mit Acetylcholinchlorid unter den gleichen Bedingungen, was die Empfindlichkeit des Systems im gleichen Maß erhöht bzw. die Meßdauer verkürzt (LINDORF 1971, MEGERLE 1975).

Als Maß für die Aktivität des zu untersuchenden Enzyms gilt das Verhältnis zwischen dem Wert der gehemmten Cholinesteraseaktivität und dem eines parallel dazu gemessenen unvergifteten Ansatzes aus demselben Serum. Die Angabe erfolgt in Prozent der Ausgangsaktivität. Die starken individuellen Schwankungen der absoluten Cholinesteraseaktivitäten werden dadurch eliminiert.
GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, BAUMGARTNER, PETENYI,

BURGIS, LINDORF und METZGER (1972) haben die Eignung der Methode u.a. dadurch unter Beweis gestellt, daß sie sie unter Anwendung von E 600 direkt mit der Methode von KRISCH verglichen und einen Korrelationskoeffizienten von 0,82 erzielt haben.

Der Verbleib von Cholinesterasehemmern verteilt sich im Serum auf mindestens drei Stationen. Ein Teil wird, seiner "Bestimmung" zufolge, an die Cholinesterase gebunden, ein weiterer an andere Serumeiweiße und der Rest wird enzymatisch abgebaut (SCUAUMANN und SCHILLER 1960). Anschließend an die Vermischung des Serums mit dem Gift wird eine Inkubationspause eingelegt, in der sich die Verhältnisse stabilisieren sollen, damit eine ausreichende Kontaktzeit des Giftes mit der Cholinesterase und den Alkylphosphat abbauenden Enzymen gewährleistet ist und nicht u.U. reversibel an die anderen Serumeiweiße gebundenes Gift die Aktivität während des Meßvorganges in unkalkulierbarer Weise beeinflusst. Im Bezug auf höchstmögliche Konstanz der Bedingungen ist der Versuchszeitplan genau einzuhalten, auch was die Inkubationszeit anbetrifft.

Der Eigenzerfall des Butyrylcholins muß in Form eines mitgeführten Leerwertes ebenfalls berücksichtigt werden. Zur Verbesserung der Genauigkeit werden alle Messungen als Doppelbestimmungen durchgeführt, aus deren beider Ergebnisse das arithmetische Mittel gebildet und davon das Mittel der Leerwerte abgezogen wird. Bei dieser Verfahrensweise können während der Versuchsperiode die Seren von drei Probanden untersucht werden.

In enger Anlehnung an die Versuchsmodalitäten, die GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) sowie GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (1973) für die Messung der Paraoxonase

erarbeitet hatten, wählten GREINER, GRIMM und MAIER die Bedingungen für die Versuche mit DFP. Ein wichtiges Problem dabei war die Bestimmung der erforderlichen DFP - Konzentration, die schon wegen der sehr viel höheren Toxizität (siehe S. 4) wesentlich anders als die von E 600 liegen mußte, um meßbare Restaktivitäten zu erhalten.

E. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

1. Vorbereitungen

1.1 Das Untersuchungsgut

Die Seren stammten von 24 Familien mit insgesamt 87 gesunden Mitgliedern. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Kinderzahl von 1,63 Kindern pro Familie. Das ganze Kontingent verteilte sich auf 46 Personen männlichen und 41 weiblichen Geschlechts. Zur Erzielung eines Kollektivs von 24 Familien war die Hinzunahme von 14 Familien der Gruppe HÄUSLER, AHNERT und BREU nötig, deren Werte nach demselben Verfahren und unter Kontrolle durch gemeinsame Bezugsmessungen ermittelt worden waren. Die Entnahme von 5 - 10 ml Venenblut wurde mit Serum-Monovetten ohne Zusatz der Fa. Sarstedt vorgenommen. Möglichst bald danach wurden die Proben bei 1600g 20 Min. lang schonend zentrifugiert, damit keine Hämolyse auftrat. Zwar schadet die dabei freiwerdende Erythrozyten - Cholinesterase, wie erwähnt, der Genauigkeit nicht, wohl aber die Verdünnung der Seren durch den Zellinhalt der Erythrozyten, wenn dieser in größerem Maße anfällt. Da noch keine gesicherten Erkenntnisse über die Langzeitstabilität einer eventuellen DFPase bestehen, wurden die Proben so schnell als möglich verarbeitet (spätestens am 2. oder 3. Tag nach der Entnahme, wenn diese an einem Wochenende erfolgte) und in der Zwischenzeit im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt.

Wir haben außerdem festgestellt, daß sich die Cholin-esteraserestaktivität nach Vergiftung mit unserer Versuchsdosis DFP fast völlig und irreversibel reduzierte, wenn die Seren vorher mit E 600 versehentlich in Kontakt gekommen waren. Es genügte zum Beispiel, wenn die mit Kunststoffstopfen verschlossenen Serumbehälter vor der Messung wenige Stunden im selben Kühltank standen, in dem auch verschlossene Behälter mit dem an sich wenig flüchtigen E 600 aufbewahrt wurden. Dieser Effekt war auffällig, wir haben ihn jedoch nicht quantitativ überprüft.

1.2 Herstellung des DFP - Ansatzes, der Verdünnungs- und Substratlösung

Die folgenden Eigenschaften von DFP erfordern besondere Maßnahmen bei der Laborarbeit:

- Hoher Dampfdruck:

Die dadurch bedingte Flüchtigkeit stellt einen starken Störfaktor für die Messungen dar. Der Ansatz ist außerhalb des Meßlabors in einem möglichst weit entfernten Raum unter dem Abzug herzustellen. Die den DFP-Ansatz herstellende Person darf das Meßlabor nicht kurz nach Beendigung seiner Arbeit betreten und muß ungereinigte Geräte und Schutzhandschuhe draußen lassen.

Der fertige Ansatz wird in einem möglichst kleinen, maßgerechten Glaskolben mit Schliffstopfen aufbewahrt, ~~dem~~ in dem miteingeschlossenen kleinen Luftvolumen kann sich zum Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes von DFP zwischen Luft und Wasser nur wenig DFP aus der Flüssigkeit entfernen und so beim Öffnen des Gefäßes jeweils auch nur wenig DFP entweichen und die Lösung nicht fortgesetzt schwächen.

- Eigenhydrolyse:

Die Reinsubstanz wird in der Tiefkühltruhe aufbewahrt, der verdünnte Arbeitsansatz ist maximal einen Tag lang verwendungsfähig, wenn er im Kühltank aufbewahrt wird (in einem anderen, als die Seren !).

- Alkaliempfindlichkeit:

Diese bietet eine sehr wirksame Reinigungsmöglichkeit für die Geräte mit Natronlauge. Bei alkalischen Rückständen in den Geräten ergibt sich jedoch die Gefahr der Beeinträchtigung der DFP - Wirkung im verdünnten Arbeitsansatz bis hin zur Zerstörung der Reinsubstanz im Originalfläschchen.

- Perkutane Wirksamkeit:

Es sind doppelte Schutzhandschuhe zu tragen (Einmalhandschuhe) und 2%ige NaOH - Lösung ist bereitzustellen, um bei einem eventuellen Hautkontakt das Gift schnell damit zu hydrolysieren.

Nun sei die eigentliche Herstellung der Lösungen beschrieben:

DFP-Ansatz I :

1 μ l DFP wird in 90 ml aqua bidest gelöst ($=1,111 \cdot 10^{-3}$ Vol.-%) und acht Minuten lang kräftig geschüttelt.

DFP-Ansatz II :

5 μ l Ansatz I wird in 40 ml Verdünnungslösung (siehe unten) gelöst ($=1,389 \cdot 10^{-7}$ Vol.-%) und ebenfalls acht Minuten geschüttelt.

Mit dem Molekulargewicht $M = 184$, der Dichte $D = 1,0622 \frac{\text{kg}}{\text{dm}^3}$ und dem Faktor 0,99 für die Reinheit des verwendeten DFP ist die Lösung in Ansatz II $8,02 \cdot 10^{-9}$ molar, nach dem Mischen mit Serum $7,22 \cdot 10^{-9}$ molar.

Die Verdünnungslösung setzt sich aus 10 Teilen 0,9%iger NaCl-Lösung und 3 Teilen 1,26%iger NaHCO_3 -Lösung zusammen.

Die Butyrylcholinjodidlösung ist 0,54%ig in aqua bidest.

Vor Beginn der Zeitmessung wird in den Hauptraum der Kölbchen (Buchst. F in Abb. 1, Seite 10) je 1,5 ml Substratlösung pipettiert, dann werden für die drei

unvergifteten Ansätze 0,15 ml Serum mit 1,35 ml Verdünnungslösung gemischt und 0,5 ml davon in die Anhangsbirne (G) gegeben. Für die Leerwerte pipettiert man 0,5 ml reine Verdünnungslösung in die Anhangsbirne.

2. Ablauf der Messung

2.1 Inkubation

Die Inkubationsphase dauert 60 Minuten und beginnt mit dem Mischen des Serums mit vergifteter Verdünnungslösung möglichst kurz hintereinander in gleichem Verhältnis wie die unvergifteten Ansätze. Nach dem Beschicken der Kölbchen und Zusammensetzen mit den Manometern (Zeitbedarf ca. 6-8 min) wird im Wasserbad von 37°C bei einer Frequenz von 100/min geschüttelt. 25 Minuten vor Schluß der Inkubation werden die Kölbchen mit einem Gemisch aus 5 % CO₂ und 95 % N₂ begast. Durch die Absättigung mit CO₂ fällt der pH-Wert von 7,7 auf 7,2 (SÜLLMANN 1961, 1964). 5 Minuten vor Schluß: Abnahme der Gaszuleitung von Anschluß (A), Verschuß der Glasstopfen (H) der Kölbchen. 3 Minuten vor Schluß wird der Inhalt der Anhangsbirnen in den Hauptraum gekippt, kurz vermischt und mit Flüssigkeit aus dem Hauptraum nachgespült. Das nun entstehende CO₂ läßt man während dieser 3 Minuten durch den noch geöffneten Manometerhahn entweichen. Jetzt hat man Zeit, die Manometer auf Mittelstellung zu justieren und die Vordifferenzen zu notieren.

2.2 Messung

Die Meßzeit dauert 30 Minuten und beginnt mit dem Verschießen der Manometerhähne. Nach 15 Minuten nimmt man eine Zwischenablesung bei den Manometern vor, bei denen die Skalenlänge wahrscheinlich nicht ausreichen wird (siehe auch S. 11), nach 30 Minuten erfolgt die Endablesung.

Die Berechnung erfolgte wie auf den Seiten 9 - 12 beschrieben, die Benennung ist $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$.

F. ERGEBNIS

In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse unserer Messungen wiedergegeben. Die Familien sind in alphabetischer Reihenfolge geordnet, die Reihenfolge innerhalb einer Familie ist Vater, Mutter, Kinder. In der Tabelle enthalten sind, außer dem Namen in der 1. Spalte, das Alter, die Cholinesterase-Ausgangsaktivität der unvergifteten Ansätze in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$, die Restaktivität der vergifteten Ansätze in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$, die Differenz beider Aktivitäten, die Restaktivität in % der Ausgangsaktivität (RA) und der letztgenannte Wert in logarithistisch transformierter Form, in Logits. Die Umrechnungsformel lautet $\ln \frac{RA}{100-RA}$; um das negative Vorzeichen nicht in der ganzen Tabelle mitführen zu müssen, lautet die Spaltenüberschrift "-RA Logits". Die Ergebnisse sind auf drei gültige Ziffern gerundet.

1. Tab. 1: Meßwerte von 24 Familien

Name	Alter	Ausg.- Aktiv.	Rest- Aktiv.	Diff. Ausg.- Rest- Aktiv.	RA	-RA Logits
1. Ahnert Günther	55	106	32,0	74	30,2	0,838
Ahnert Grete	42	173	22,8	150	13,2	1,883
Ahnert Andreas	23	190	52,1	138	27,4	0,974
2. Böckler Hans	53	188	45,1	143	24,0	1,153
Böckler Betty	52	215	73,3	142	34,1	0,659
Böckler Hans	25	201	31,8	169	15,8	1,673
Böckler Rainer	23	182	53,0	129	29,1	0,891
3. Breu Karl	52	205	44,1	161	21,5	1,295
Breu Luise	51	205	71,5	134	34,9	0,623
Breu Karl	25	211	61,6	149	29,2	0,896
Breu Thomas	18	140	31,9	108	22,8	1,220

Tab. 1, Fortsetzung:

Name	Alter	Ausg.- Aktiv.	Rest- Aktiv.	Diff. Ausg.- Rest- Aktiv.	RA	-RA Logits
4. Büchler Hans	50	184	64,4	120	35,0	0,619
Büchler Betty	48	150	44,3	106	29,5	0,871
Büchler Hans	15	145	36,7	108	25,3	1,083
5. Bütterich Franz	55	267	96,4	171	36,1	0,571
Bütterich Karolina	53	252	88,7	163	35,2	0,610
Bütterich Franz	27	254	76,2	178	30,0	0,847
6. Burger Dietrich	44	178	41,5	137	23,3	1,191
Burger Veronika	40	142	31,7	110	22,3	1,248
Burger Markus	16	159	28,6	130	18,0	1,516
7. Dr. Burger Hanns	50	213	60,1	153	28,2	0,935
Burger Ilse	48	167	43,8	123	26,2	1,036
Burger Brigitte	24	173	43,6	129	25,2	1,088
8. Förtsch Andreas	57	212	49,4	163	23,3	1,191
Förtsch Anna-Beate	55	164	29,7	134	18,1	1,510
Förtsch Brigitte	23	271	110,8	160	40,9	0,368
9. Funk Erhard	51	316	51,8	264	16,4	1,629
Funk Inge	51	217	107,4	110	49,5	0,020
Funk Richard	25	161	29,9	131	18,6	1,476
10. Greim Gerhardt	51	129	19,4	110	15,0	1,735
Greim Eva	49	168	36,3	132	21,6	1,289
Greim Gaby	22	114	14,0	100	12,3	1,964
11. Häusler Franz-Xaver	54	224	65,2	159	29,1	0,891
Häusler Irmgard	51	197	47,7	149	24,2	1,142
Häusler Elisabeth	23	176	36,3	140	20,6	1,349
Häusler Martin	21	192	31,5	160	16,4	1,629

Tab. 1, Fortsetzung:

Name	Alter	Ausg.- Aktiv.	Rest- Aktiv.	Diff. Ausg.- Rest- Aktiv.	RA	-RA Logits
12. Laubmann Arno	72	242	100,9	141	41,9	0,335
Laubmann Edith	58	188	47,9	140	25,5	1,072
Laubmann Hans-D.	29	184	60,7	143	33,0	0,708
13. Lipp Rudolf	65	195	49,5	145	25,4	1,077
Lipp Ruth	63	175	40,1	135	22,9	1,214
Wichtermann Inge	37	171	31,3	140	18,3	1,496
Müller Barbara	29	117	16,7	100	14,3	1,791
Lipp Reinhard	21	197	70,9	126	36,0	0,575
14. Manger Heinz	55	245	102,9	143	42,0	0,323
Manger Gertrud	49	168	26,4	142	15,7	1,681
Manger Bernhard	22	195	52,8	142	27,1	0,990
Manger Susanne	14	176	36,8	139	20,9	1,331
Manger Sabine	14	201	49,6	151	24,7	1,115
15. Mittermeier Karl	44	174	42,8	131	24,6	1,120
Mitterm. Waltraud	43	127	16,0	111	13,6	1,726
Mitterm. Angelika	23	162	28,2	134	17,4	1,558
Mitterm. Karl-H.	20	147	35,3	112	24,0	1,153
16. Niebler Richard	34	181	58,3	123	32,2	0,746
Niebler Marianne	31	176	23,8	156	13,5	1,857
Niebler Martina	13	126	20,7	105	16,4	1,629
Niebler Doris	10	131	14,7	116	11,2	2,070
17. Richter Max	54	182	26,8	155	14,7	1,758
Richter Hedda	49	199	39,4	160	19,8	1,399
Richter Monika	23	142	30,7	111	21,6	1,289

Tab. 1, Fortsetzung:

Name	Alter	Ausg.- Aktiv.	Rest- Aktiv.	Diff. Ausg.- Rest- Aktiv.	RA	-RA Logits
18. Rieger Lutz	39	189	34,0	155	18,0	1,516
Rieger Edith	35	256	80,1	176	31,3	0,786
Rieger Christine	14	184	49,9	134	27,1	0,990
Rieger Andrea	13	214	52,9	161	24,7	1,115
19. Seiter Berthold	59	131	19,4	112	14,8	1,750
Seiter Friedgard	50	128	17,7	110	13,8	1,832
Seiter Susanne	20	80	15,1	65	18,9	1,457
20. Spießl Karl	37	271	111,7	159	41,2	0,356
Spießl Anna	37	160	20,8	139	13,0	1,901
Spießl Rudi	18	238	83,8	154	35,2	0,610
Spießl Martin	8	185	39,6	145	21,4	1,301
21. Sterner Johann	47	74	10,8	63	14,6	1,766
Sterner Lotte	43	121	18,6	102	15,4	1,704
Sterner Horst	20	122	26,8	95	22,0	1,266
22. Wolf Alfons		189	39,9	149	21,1	1,319
Wolf Anna		209	46,6	162	22,3	1,249
Wolf Herbert	23	216	81,4	135	37,7	0,502
23. Wollenweber Werner	54	193	45,7	147	23,7	1,169
Wollenweber Ingrid	49	141	35,0	106	24,8	1,109
Wollenweber Hannes	21	130	38,1	92	29,3	0,881
Wollenweber Uli	25	118	39,2	79	33,2	0,699
Wollenweber Matth.	24	132	30,5	102	23,1	1,203
24. Wunsch Franz	57	211	58,9	152	27,9	0,949
Wunsch Gerdi	53	200	44,2	156	22,1	1,260
Wunsch Ingrid	20	205	63,3	142	30,9	0,805
Wunsch Norbert	12	178	27,1	151	15,2	1,719

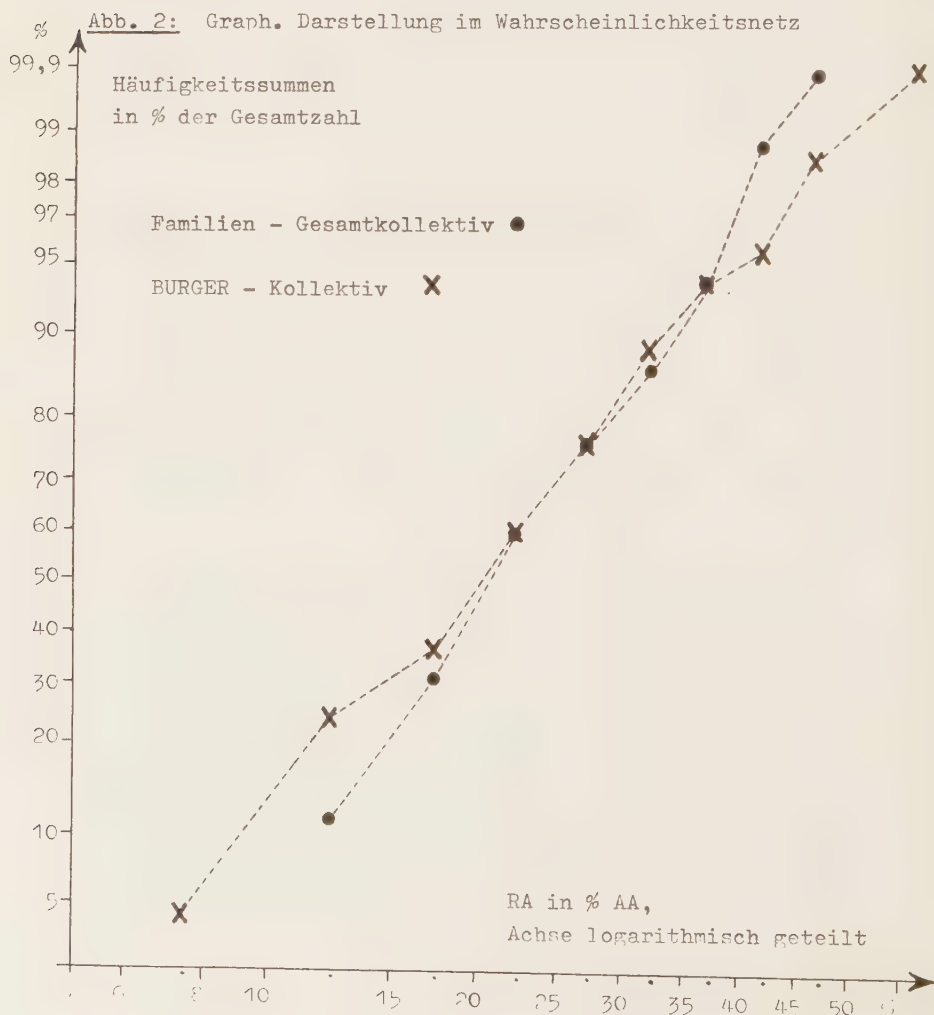
2. Prüfung der Frage einer autosomalen Vererbung

Um die Erbllichkeit der Restaktivität der menschlichen Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit DFP im Sinne eines einfachen zwei-Allele-Modells methodisch nachweisen zu können, wie dies bei der Paraoxonase geschehen ist (u.a. DUMBACH 1976), wäre die Unterscheidung von Aktivitätsgruppen notwendig, die es zudem gestatten muß, letztlich jedes Mitglied einer Familie klar einer bestimmten Gruppe und somit einem bestimmten Genotypus zuzuordnen. Erst dann könnte die Gültigkeit der Vererbungsgesetze von Mendel und der Hardy-Weinberg-Regel überprüft werden und eine Aussage bezüglich einer autosomalen Vererbung gemacht werden.

BURGER (1979) untersuchte eine Korrelation der menschlichen Serum-Paraoxonaseaktivität und der Serum-Cholinesteraserestaktivität nach Vergiftung mit DFP bei 70 nicht verwandten Personen und fand als wesentliches Unterscheidungsmerkmal zur Paraoxonase keine Aufteilung in Aktivitätsgruppen, sondern eine Normalverteilung der Cholinesteraserestaktivitäten nach Vergiftung mit DFP nach logistischer Transformation der Werte. Das weibliche Geschlecht besitzt dabei eine etwas geringere mittlere Restaktivität, als das männliche (MÜLLER 1979, siehe auch S. 28).

Da die Cholinesterase-Restaktivität nicht linear von der Giftkonzentration abhängt, sondern logarithmisch, wurde für die graphische Darstellung gemäß der logistischen Transformation nach KOLLER (1955) die Abszisse mit $\ln \frac{RA}{100-RA}$ geteilt (mit RA = Restaktivität in % der Ausgangsaktivität). Zusammen mit einer Unterteilung der Ordinate nach dem Gaußschen Integral und Auftragen der Häufigkeitssummen in % der Gesamtzahl (=Wahrscheinlichkeitsnetz) erhält man durch diese doppelte "Linearisierung" für Bereiche idealer Normalverteilung Geradenabschnitte.

In der folgenden Abbildung 2 sind die Meßwerte aller Familienmitglieder gemeinsam aufgeführt. Abweichungen von der erwarteten Normalverteilung durch eine möglicherweise erblich verursachte Gewichtung von Restaktivitäten in einer Familie, die allerdings deutlich vom Gesamtmittelwert abweichen müssten, wären dabei möglich und müssten diskutiert werden. Zum Vergleich wurden die Werte des BURGERschen nicht verwandten Kollektivs mit eingetragen.



Die gute Linearität des Graphen dokumentiert eine unimodale Normalverteilung. Im Vergleich der Familienkurve mit der der nicht verwandten Personen ist die erste sogar noch unauffälliger. An den oberen und unteren Enden der Kurven können bereits durch einen Grenzfall merkbare Abweichungen hervorgerufen werden, da die Kollektive noch klein sind. Unter diesem Gesichtspunkt sind die Differenzen in Abb. 2 von untergeordneter Bedeutung.

Eine unimodale Normalverteilung erfüllt natürlich die am Anfang des Kapitels genannten Grundvoraussetzungen für eine autosomale Vererbung bei weitem nicht.

3. Prüfung der Frage einer polygenen Vererbung

Wenn bezüglich der Vererbung so "unklare" Verhältnisse herrschen wie im vorliegenden Fall, besteht noch die Möglichkeit der Beteiligung von mehreren bis vielen Genen am Bau eines Enzyms. Dieses polygen gesteuerte Enzym läßt Zuordnungen auf Grund seiner Eigenschaften zum Zweck der Analyse der Erbllichkeit im Einzelfall meist nicht zu. Wenn gar eine Anzahl von Genen beteiligt ist, die in ähnlicher Wirkung innerhalb einer untersuchten Population sehr häufig sind, wie z.B. für die Ausbildung von Rassemerkmalen, führt eine Erbllichkeitsuntersuchung kaum zu positiven Ergebnissen.

Die Behandlung eines solchen Problems erfordert statistische Methoden. Für ein sinnvolles Arbeiten sind größere Fallzahlen notwendig. Da diese Forderung durch die mir zur Verfügung stehende Zahl oft nicht befriedigend erfüllt wird, kann der folgende Teil nur als Wegweiser, als Verfahrensmöglichkeit gewertet werden soweit nicht signifikante Ergebnisse erzielbar waren.

Einführend sind auf der nächsten und übernächsten Seite einige Gesetzmäßigkeiten aufgeführt, die auf die polygene Vererbung zutreffen (nach LENZ, 1976).

Bei der polygenen Vererbung besitzen für jeden Einzelvorgang die Mendel-Gesetze und die Hardy-Weinberg-Regel über die Genhäufigkeit bei zwei Allelen Gültigkeit. Zunächst gilt unter der stark vereinfachenden Annahme, daß jeder neu hinzukommende Genlocus gleiche Genhäufigkeit und gleiche additive oder intermediäre gleiche Wirkungsstärke besitzt ($a_n \hat{=} a_1$; $b_n \hat{=} b_1$; $n = \text{Anz. d. Genloci}$): $(a + b)^{2n} = 1$. Die resultierende Binomialverteilung zeigt bereits ab $n=3$ eine gute Annäherung an eine Normalverteilung. Auch bei ungleich häufigen und ungleich starken Genwirkungen ergibt sich eine Normalverteilung, wenn man fordert, daß keine Richtung und Häufigkeit bevorzugt wird.

Durchschnittlich stimmen Kinder in der Hälfte ihrer Genzahl mit den Eltern sowie in der Hälfte mit ihren Geschwistern überein. Bei einem in einer Population seltenen Gen ist die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens bei Eltern und Kindern bzw. zwischen Geschwistern 0,5; bei in einer Population allgemein sehr häufigen Genen unterscheidet sie sich nicht von allen anderen.

Ist das Gen mit einer Eigenschaft seines Trägers verknüpft, die eine Auslese bei der Wahl des Partners bewirkt, z.B. Intelligenz, Rasse, steigt die Korrelation stärker als zu erwarten wäre (Homogamie). Eine ideale Verteilung der Gene (unbeeinflusst) nennt man Panmixie.

Ist eine bedeutende Zahl von Allelenpaaren vorhanden, von denen eines dominant ist, verringert sich die Korrelation je nach Grad und Häufigkeit der Dominanz, da die Heterozygoten nur mit den Eigenschaften der Dominanten zu Buche schlagen. In einem solchen Fall sei berücksichtigt, daß das gemeinsame homozygote Auftreten zweier Elternteile bezüglich desselben Gens seltener ist, als das zweier Geschwister.

Der meßbare Ausdruck einer individuellen Genkonstellation, im vorliegenden Fall RA, ist außerdem von äußeren Einflüssen und anderen schwankenden körperlichen Größen abhängig (Schwangerschaft, Blutverlust, Hepatitis etc.).

Eine Vorstellung von den unter bestimmten Voraussetzungen erzielbaren Ergebnissen liefert die folgende Tabelle 2. Die Korrelationskoeffizienten einer Erblichkeitsuntersuchung nähern sich bei positivem Ergebnis den Tabellenwerten umso besser, je größer die untersuchte Fallzahl ist.

Tabelle 2 : Theoretische Korrelation zwischen Verwandten unter verschiedenen Bedingungen der Genwirkung und der Homogamie (HOBGEN und STANTON, zit. n. TANNER, 1953 u. LENZ 1976)

Verwandtschaft	Bei Panmixie		Bei Homogamie seit drei Generationen. Korrelation der Ehegatten von +0,25
	Heterozygoten intermediär	Vollständige Dominanz	Heterozygoten intermediär
Eltern - Kind	0,50	0,33	0,63
Geschwister	0,50	0,42	0,63

(Für den Fall vollständiger Dominanz ist gleiche Häufigkeit der Allele angenommen)

Sicheren Aufschluß über die Erblichkeit gäbe die Untersuchung von eineiigen Zwillingen. Sie brähte wegen des gleichen genetischen Materials im Rahmen der Meßgenauigkeit und der Umwelteinflüsse gleiche Ergebnisse, wenn die Restaktivität der menschlichen Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit DFP erblich wäre. Leider war es nicht möglich, eineiige Zwillinge in den Versuch einzubeziehen.

Für alle nun folgenden Berechnungen und Graphen wurden die logistisch transformierten Werte (Logits) verwendet.

Zur Erblchkeitsuntersuchung wurden die Eltern- Kind-Korrelationen und eine Geschwister-Varianzanalyse erstellt. Um eine Verfälschung durch eventuelle geschlechts- oder alters- und generationsspezifische Unterschiede eliminieren zu können, wurden die männlichen den weiblichen Familienmitgliedern sowie die Väter den Söhnen und die Mütter den Töchtern mit Hilfe eines Student - Tests (t-Test) gegenübergestellt. Der Vergleich der Generationen wurde mit gleichgeschlechtlichen Partnerndurchgeführt, um einen Geschlechtsunterschied von vornherein nicht zum Tragen kommen zu lassen.

Es folgen die Formel und die Ergebnisse der t-Tests:

$$t_o = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} \cdot \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}}$$

Zahl der Freiheitsgrade = $n_1 + n_2 - 2$

	$n_{1/2}$	$\bar{x}/\bar{y}$	$s_{1/2}$
Männliche Familienmitgl.	46	-1,088	0,412
Weibliche Familienmitgl.	41	-1,300	0,456

$t_o = 2,28$; 85 Freiheitsgrade; $P = 2,5\%$

Väter	24	-1,093	0,457
Söhne	22	-1,082	0,366

$t_o = 0,09$; 44 Freiheitsgrade

Mütter	24	-1,237	0,483
Töchter	17	-1,331	0,421

$t_o = 0,65$; 39 Freiheitsgrade

Der Unterschied zwischen den Geschlechtern ist signifikant. Der zugehörige t-Wert ergibt fast genau eine Signifikanzschranke $\alpha = 0,05$. Zwischen den Mittelwerten der Väter und Söhne und der Mütter und Töchter zeigt sich kein signifikanter Unterschied (die t-Werte für $\alpha = 0,05$ müßten $\geq 2,02$ sein).

Die Eltern-Kind-Gegenüberstellung erfolgte mit Hilfe der Korrelationsrechnung. War mehr als ein Kind in der Familie, wurde für jedes Kind ein Eltern-Kind-Paar gebildet. Um einen eventuell vorhandenen Homogamiesachverhalt zu beurteilen, wurde eine Väter-Mütter-Korrelation erstellt. Für den Vergleich der Geschwister untereinander benutzte ich die einfache Varianzanalyse. Die Werte der Mädchen wurden gemäß des Unterschieds der Mittelwerte der Geschlechter zu denen der Knaben

"korrigiert": $x_{iM} = y_{iM} + (\bar{x}_K - \bar{y}_M)$; (x_{iM} =korr. Wert, y_{iM} =Ausgangswert/Mädchen; entsprechend einer Aufeinanderverschiebung beider Verteilungskurven).

Korrelationsrechnung:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{s_x \cdot s_y};$$

Die Korrelationskoeffizienten sind in den Abb. 3-7 aufgeführt.

Abb. 3: Elternkorrelation

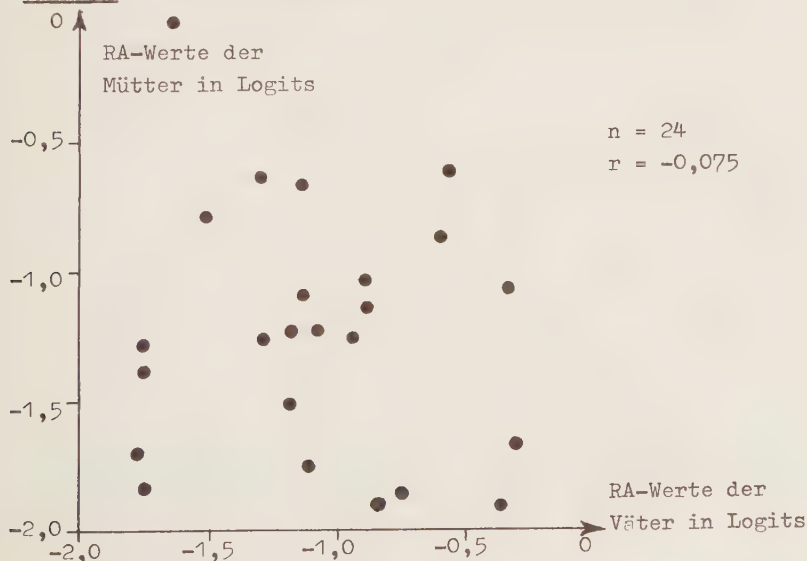


Abb. 4: Vater - Sohn - Korrelation

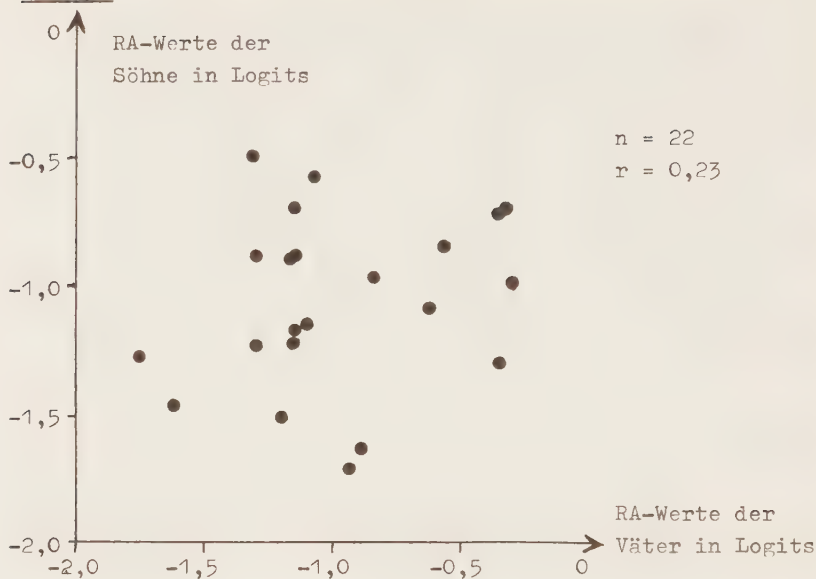


Abb. 5: Mutter - Tochter - Korrelation

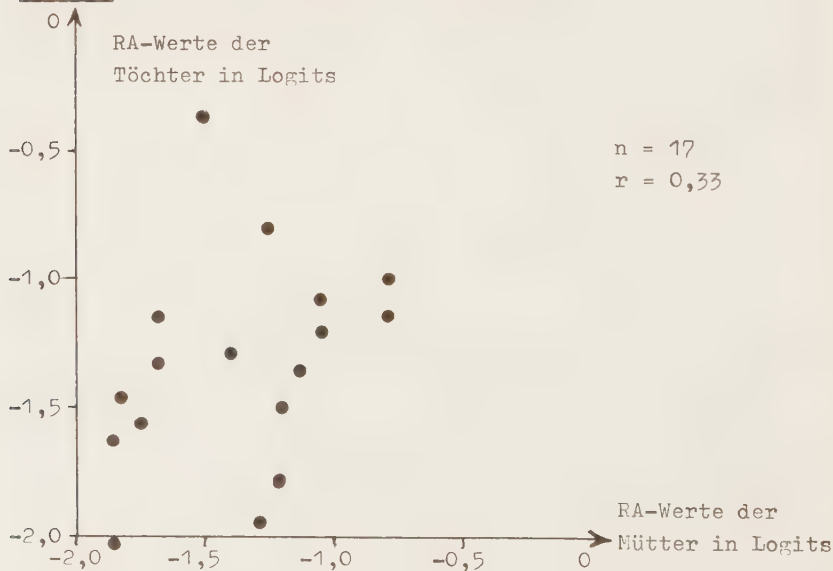


Abb. 6: Vater - Tochter - Korrelation

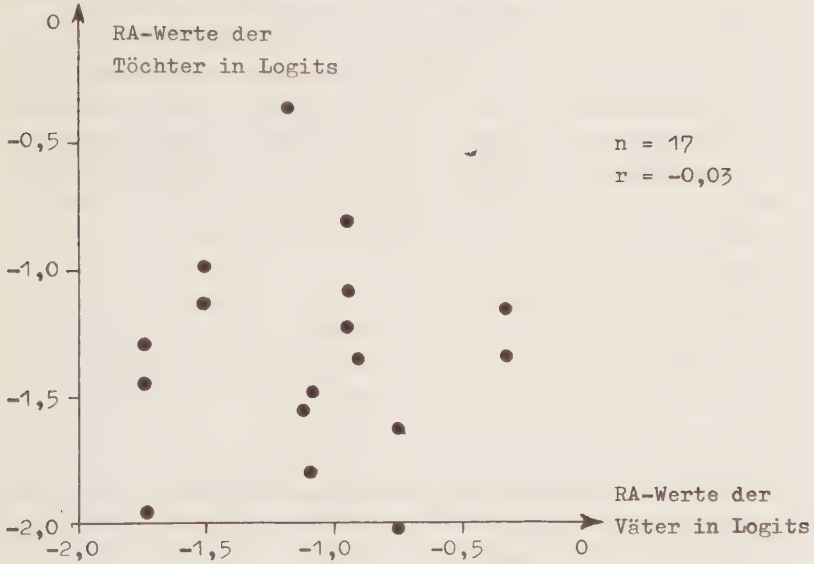
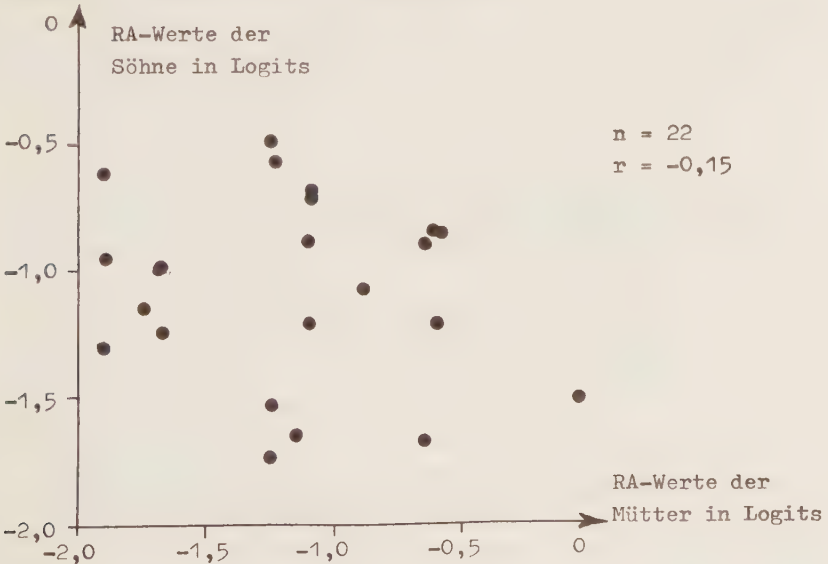


Abb. 7: Mutter - Sohn - Korrelation



Bei den Kollektiven der Abb. 3-7 ließe der Korrelationskoeffizient wegen mangelnder Probandenzahlen Zusammenhänge erst ab einem Wert von etwa 0,5 aufwärts signifikant erscheinen. Aus der graphischen Darstellung eventuell erahnbare Zusammenhänge, z.B. zwischen Vätern und Söhnen bzw. zwischen Müttern und Töchtern, die ja ein Anhaltspunkt für eine wenigstens zum Teil geschlechtsgebundene Vererbung sein könnte, entziehen sich deshalb einer genauen Bearbeitung. Dabei wird ihre Existenz nicht gleichzeitig ausgeschlossen.

Geschwister-Varianzanalyse, Prüfwert F:

$$F = \frac{\frac{1}{t-1} \sum_{i=1}^t n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{\frac{1}{N-t} \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2} = \frac{\frac{1}{t-1} s_i}{\frac{1}{N-t} s_{j(i)}}$$

Geschwister: N=27; Familien: t=12; $\bar{x}=1,102$

	Freiheitsgrade	SAQ	MAQ	Prüfwert F
Unter den Familien	t-1 = 11	s _i = 1,179	M _i = 0,107	F = 0,733
innerhalb der Familien	N-t = 15	s _{j(i)} = 2,187	M _{j(i)} = 0,146	

Für (11,15) Freiheitsgrade ergibt sich mit F=0,733 kein Zusammenhang zwischen den Geschwistern. Setzt man die Signifikanzschranke $\alpha = 0,05$, müßte F = 2,51 sein.

G. DISKUSSION

Es war die Aufgabe dieser Arbeit, eine mögliche Erbllichkeit der Restaktivität der menschlichen Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit DFP zu finden und zu beschreiben. Hierfür standen mir die Serum-Cholinesterase-Restaktivitäten von 24 Familien, gemessen bei einer DFP-Konzentration von $7,2 \cdot 10^{-9}$ Mol/l, als Parameter zur Verfügung.

Bisher wurde für das Enzym kein Polymorphismus gefunden, vielmehr zeigten die Werte in guter Näherung eine unimodale Normalverteilung. Eine autosomale Vererbung liegt nach dieser Erkenntnis nicht vor, es bleibt die Möglichkeit einer polygenen Vererbungsweise.

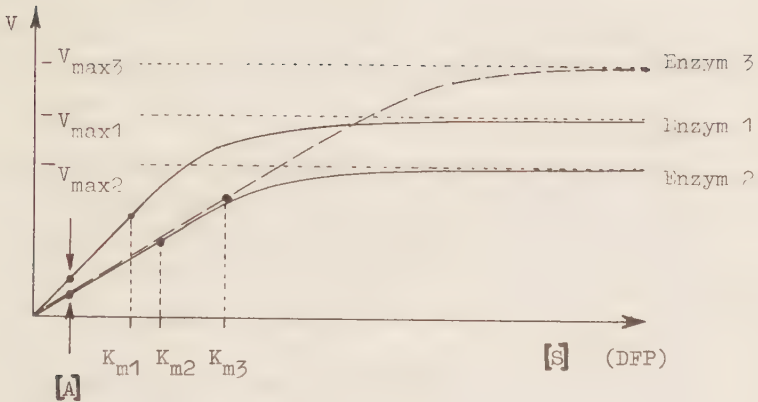
Zwischen den Geschlechtern ergab sich ein signifikanter Unterschied der durchschnittlichen Restaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität. Der Mittelwert der Männer liegt hier um 3,4% über dem der Frauen. Zur Untersuchung wurden die Familien in folgende Gruppen unterteilt: Vater-Mutter-Korrelation zur Beurteilung eines eventuellen Homogamie-Sachverhaltes (siehe S. 26), sowie Vater-Sohn, Mutter-Tochter, Vater-Tochter, Mutter-Sohn-Korrelation zur Beurteilung der Erbllichkeit. Die dadurch erforderliche Paarung je zweier Werte läßt den Faktor n der Einzelkorrelationen auf Zahlen sinken, die Zusammenhänge erst ab einem Korrelationskoeffizienten von etwa 0,5 an aufwärts signifikant hätten erscheinen lassen können. Auch die Geschwister-Varianzanalyse ergab keine außergewöhnlichen Übereinstimmungen.

Selbst bei einer großen Probandenzahl gestattet die Korrelationsrechnung keine genetisch quantitativen Aussagen. Häufigkeit und Wirkungsstärken der dominanten Gene, Umwelteinflüsse, augenblickliche körperliche Disposition des Blutspenders sind wechselnde, größtenteils unbekannte Faktoren. Auch mußte ich auf wertvolle Zwillingsuntersuchungen verzichten.

Unter diesen Aspekten kann in Verbindung mit meinen Ergebnissen von einer Erbllichkeit der Restaktivität der menschlichen Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit DFP nicht ausgegangen werden.

Anlaß zu einer gewissen Unsicherheit geben u.U. die ermittelten Meßwerte. Die hohe Toxizität des DFP zwingt zu einer Arbeit mit äußerst geringen Konzentrationen. Es ist nicht bekannt, ob die Cholinesterase-DFP-Verbindung so schnell vonstatten geht, daß eine DFPase-Wirkung gar nicht zum Zuge kommt und die Restaktivität vorwiegend durch "übrige", nicht durch DFP austitrierte Cholinesterase entsteht. Allerdings kennt man noch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den entsprechenden Ausgangs- und Restaktivitäten. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß sich der Entgiftungseffekt darin erschöpft, daß sie DFP in der von uns verwendeten geringen Konzentration an andere Serumeiweiße anlagert und eine angenommene DFPase erst dann in Aktion treten kann, wenn diese "Pufferkapazität" bei höheren DFP-Konzentration erschöpft ist. Ein solcher Effekt würde zu der weitgehenden erbunabhängigen unimodalen Normalverteilung passen. Naheliegend ist auch der Gedanke an die unzulängliche Unterscheidbarkeit zweier Enzymvarianten unter nicht allzu speziellen Voraussetzungen. Bei der angewandten Methode ist die Konzentration des Indikatorenzyms und die Konzentration des zu messenden Enzyms durch das Serum fest vorgegeben. Man muß sich mit der Giftkonzentration nach der im Serum vorhandenen Cholinesterase richten, um ein meßbares Ergebnis zu erhalten. Die so entstandenen $7,2 \cdot 10^{-9}$ Mol/l liegen einige Zehnerpotenzen unter einer anzunehmenden Michaeliskonstanten und machen folgenden in Abb. 8 veranschaulichten Effekt denkbar:

Abb. 8:



Die Enzyme 1 und 2 verhalten sich in ihrer Kinetik zueinander wie zwei Paraoxonasevarianten. Sie sind wegen des unterschiedlich steilen Geschwindigkeitsanstiegs im ungesättigten Bereich ($K_{m1} < K_{m2}$ und $V_{max1} > V_{max2}$) bei der Substratkonzentration $[A]$ eines Versuchs weit unterhalb aller K_m -Werte gut zu unterscheiden. Das ist zwischen Enzym 2 und 3 bei der Konzentration $[A]$ schlecht möglich, da der Anstieg im ungesättigten Bereich sehr ähnlich ist ($K_{m3} > K_{m2}$ und $V_{max3} > V_{max2}$). Hier träte der Unterschied erst bei Ermittlung der unterschiedlichen V_{max} -Werte zu Tage.

Derartigen widrigen Umständen wird die von GELDMACHER-v. MALLINCKRODT beabsichtigte manometrische Messung des freiwerdenden F^- bei Übervergiftung mit $10^{-5} M$ DFP nicht ausgesetzt sein.

Literaturverzeichnis

1. AHNERT, A.
Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)
2. ALDRIDGE, W.N.
Serum esterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl-acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.
Biochem. J. 53, 110 (1953 a)
3. ALDRIDGE, W.N.
Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953 b)
4. AMMON, R.
Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)
5. AUGUSTINSSON, K.-B. and HEIMBÜRGER, G.
The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
Biochem. Biophys. Acta 13 303 (1954 a)
6. AUGUSTINSSON, K.-B. and HEIMBÜRGER, G.
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
I. Occurrence of enzymes hydrolysing dimethylamido-ethoxyphosphoryl cyanide (Tabun).
Acta Chem. Scand. 8, 753 (1954 b)

7. AUGUSTINSSON, K.-B. and HEIMBÜRGER, G.
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
II. Analysis of reaction products in experiments
with Tabun and some properties of blood plasma tabunase.
Acta Chem. Scand. 8, 762 (1954 c)
8. AUGUSTINSSON, K.-B. and HEIMBÜRGER, G.
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
III. Effect of cholinesterase inhibition and inhibition
of cholinesterase in the presence of tabunase.
Acta Chem. Scand. 8, 915 (1954 d)
9. AUGUSTINSSON, K.-B. and HEIMBÜRGER, G.
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
IV. Specificity studies.
Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954 e)
10. AUGUSTINSSON, K.-B. and HEIMBÜRGER, G.
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation of
cholinesterase by organophosphorus compounds in vitro.
Acta Chem. Scand. 9, 310 (1955 a)
11. AUGUSTINSSON, K.-B. and HEIMBÜRGER, G.
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
VII. The stereospecificity of phosphorylphosphatase.
Acta Chem. Scand. 11, 1371 (1957)
12. BAUMGARTNER, W.
Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen
fermentativem E 600-Abbau und Vergiftung der Cholin-
esterase durch E 600 im menschlichen Serum.
Dissertation Erlangen, 1970

13. BREU, K.
Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)
14. BURGER, B.
Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)
15. CLARKE, R.
Stumme Waffen. Chem. u. biolog. Kriegführung.
Zsolnay Wien / Hamburg 1969
16. DUMBACH, J.
Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen
Serumparaoxonase (EC 3.1.1.2).
Dissertation Erlangen (1976)
17. ERDÖS, E.G. and BOGGS, L.E.
Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
Nature 190, 716 (1961)
18. FRIEDBERG, K.D. und SAKAI, P.
Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkyl-
phosphaten (E 600, E 605, Sytox) im Blut und Hirn-
gewebe mit Hilfe eines fermentaaktivierenden Antidots
(Pyridin-Aldoxim-Methyljodid = PAM).
Dtsch. Z. ges. gericht. Med. 47, 580 (1958)
19. GEIGY, J.R.
Documenta Geigy, Mathematische Statistik.
Sonderdruck aus wiss. Tabellen Geigy, 7. Aufl.
J.R. Geigy Basle Switzerland (1968)
20. GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M. und LINDORF, H.H.
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholin-
esterasen mit Alkylphosphaten.
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft
für Rechtsmedizin in Berlin, 6. - 9.10.1969

21. GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M., RABAST, U. und LINDORF, H.H.

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600.

Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

22. GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M., BAUMGARTNER, W., PETENYI, M., BURGIS, H. LINDORF, H.H. und METZNER, H.

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität der E 600-spaltenden Enzymsystems in menschl. Seren.

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

23. GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.H., PETENYI, M., FLÜGEL, M., FISCHER, T. und HILLER, T.

Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase (E.C. 3.1.1.2)

Humangenetik 17, 331 (1973)

24. GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M., PETENYI, M., FLÜGEL, M., BURGIS, H., DIETZEL, B., METZNER, H., NIRSCHL, H. und RENNER, O.

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase.

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973)

25. FLÜGEL, M. und GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M.

Zur Kinetik des Paraaxon-spaltenden Enzyms im menschlichen Serum (EC 3.1.1.2)

Klin. Wochenschr. 56, 911 (1978)

26. GOEDDE, H.W., DOENIKE, A. und ALTLAND, K.

Pseudocholinesterasen

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1967)

27. GREINER, G.
Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)
28. GRIMM, H.
Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)
29. GROB, D., LILIENTHAL, J.L.Jr., HARVEY, A.M.,
JONES, B.F. and TALBOT, S.A.
The administration of diisopropylfluorophosphate
(DFP) to man.
I. Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase;
general systemic effects; use in study of hepatic
function and erythro-poiesis; and some properties
of plasma cholinesterase.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81, 217 (1947)
30. GROB, D., LILIENTHAL, J.L.Jr., HARVEY, A.M.,
JONES, B.F. and TALBOT, S.A.
The administration of diisopropylfluorophosphate
to man.
IV. The effects on neuromuscular function in normal
subjects and in myasthenia gravis.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81, 267 (1947)
31. HANSEN, D., SCHAUM, E. und WASSERMANN, O.
Organverteilung und Stoffwechsel von DFP (Diiso-
propylfluorophosphat) beim Meerschweinchen.
Arch. Toxikol. 23, 73 (1968)
32. HÄUSLER, E.
Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)
33. KOELLE, O.
Manometrie
B. Braun Apparatebau, Melsungen

34. KOLLER, S.

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse
in Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der
physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse,
Bd. II, S. 931, 1016 ff

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1955

35. KRISCH, K.

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-
phosphat durch menschliches Serum.

Z. Chem. Klin. Biochem. 6, 41 (1968)

36. LENZ, W.

Medizinische Genetik

Thieme Verlag Stuttgart, 3. Aufl. (1976)

37. LORKE, D. und KIMMERLE, G.

Die Wirkung von Reaktivatoren bei der Vergiftung
mit Phosphorsäureestern.

Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharm. 263, 237 (1969)

38. MAIER, T.

Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)

39. MAZUR, A. and BODANSKI, O.

The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of
cholinesterase activity by diisopropylfluorophosphate.

J. Biol. Chem. 163, 261 (1946a)

40. MAZUR, A. and BODANSKI, O.

An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the
phosphorus-fluorine bond of alkylfluorophosphates.

J. Biol. Chem. 164, 271 (1946b)

41. MEGERLE, U.

Vergleichende Untersuchungen zur optimalen Bestimmung der Paraoxonasetypen im menschlichen Serum mit verschiedenen Substraten.

Dissertation Erlangen, 1975

42. MÜLLER, C.

Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)

43. ROSIVAL, L., VRBOVSKY, L. und SELECKY, F.V.

Toxikologia a farmakobiodynamika organofosforovych zlucenin.

Bratislava Vydavatel stvo Slovenskej akademie vied (1959)

Zitat nach LORKE, D. und KIMMERLE, G. (1969)

44. SCHAUMANN, W. und SCHILLER, M.

Inaktivierung von Alkylphosphiten im Gehirn und im Serum.

Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 239, 114 (1960)

45. SCHRADER, G.

Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphorverbindungen.

Verlag Chemie Weinheim (1952)

46. SCHRADER, G.

Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester.

Verlag Chemie Weinheim (1963)

47. SKRINJARIC-SPOLJAR, M. and REINER, E.
Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and
ethyl-p-nitrophenylphosphate by human sera.
Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)
48. STANTON, R.G.
Filial and fraternal correlations in successive
generations.
Ann. Eugen. (Lond.) 13 (1946)
49. SÜLLMANN, E.
Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebs-
stoffwechsels.
In Hoppe-Seyler, Handbuch der physiologisch- und
pathologisch-chemischen Analyse, Bd. VI - A .
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1964)
50. TANNER, J.M.
Inheritance of morphological and physiological traits.
In Clinical Genetics, hrsg. von A. Sorsby
Butterworth, London 1953
51. UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. and STAUFFER, J.F.
Monometric techniques.
Burgess Publishing Company, Minneapolis (1964)
52. ZECH, R., ZÜRCHER, K.
Organophosphate splitting serum enzymes in different
mammals.
Comp. Biochem. Physiol. (B) 48, 427 (1974)

An dieser Stelle danke ich Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher - v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, für ihr stets freundliches Entgegenkommen und die großzügige Verwendung ihrer knapp bemessenen Zeit.

Herrn Dr. G. Hommel aus dem Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation sei für seinen Rat zur statistischen Betrachtung des Themas herzlich gedankt.

Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling, Direktor des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Erlangen - Nürnberg, bin ich für die Übernahme des Korreferates zu Dank verpflichtet,

LEBENS LAUF

Personalien: Hans Böckler

geb. am 16. Januar 1953 in Feuchtwangen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Hans Böckler, Kaufmann

Betty Böckler, geb. Hauck

Ausbildung: 1959 - 1964 Volksschule in Bechhofen

1964 - 1973 Platen-Gymnasium Ansbach

1973 Abitur

1973 - 1974 Wehrdienst in Regensburg

WS 1974 -

WS 1979 Studium der Zahnmedizin an
der Universität Erlangen-Nürnberg

31. 3. 1977 Zahnärztliche Vorprüfung

4. 12. 1979 Zahnärztliche Prüfung

